



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

DIRECCIÓN DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

Trabajo de Tesis

Anticuerpos policlonales como herramienta de diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de papa *Solanum tuberosum* L, Nicaragua 2025

Autores

Br. Deyvin Oward Pérez Altamirano
Br. Andrés Antonio Pichardo

Asesor

MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez

Presentado a la consideración del honorable Comité Evaluador como requisito final para optar al grado de Ingeniero en Sanidad Vegetal

Managua, Nicaragua
Diciembre, 2025

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Comité Evaluador designado por la Dirección de ciencias agrícolas como requisito final para optar al título profesional de:

Ingeniero en Sanidad Vegetal

Miembros del Comité Evaluador

Presidente (MSc. Trinidad Castillo
Arévalo)

Secretario (MSc. Rosario Chavararría)

Vocal (MSc. Víctor Hugo Rodríguez Salguera)

Lugar y Fecha:

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios, por ser mi fortaleza y guía en cada paso de mi camino.

A mi abuela Rosa María Ruíz, el ser humano más especial que ha marcado mi vida. Aunque ya no estés en este plano, tu amor, tus palabras y tu ejemplo siguen vivos en cada paso que doy. Esta tesis es también tuya porque nace con la promesa que un día te hice y que hoy con el corazón lleno de orgullo y gratitud, he cumplido. En honor a tu memoria, abuela, porque sembraste en mí principios, valores, la fuerza y fe para nunca desistir.

A mi madre Ana Aracely, mi principal motor de superación; y a mis hermanos, quienes me inspiran cada día a ser una mejor persona y un modelo para seguir.

A mi abuelo René Smith Hunter, por ser un ejemplo de persona, cristiano, y patriotismo.

A mi comunidad, La Bastilla y a su gente humilde y trabajadora, que con sus ejemplos me motivan a prepararme para servirles con ética y entrega.

Y, por último, pero no menos importante, a mi patria, Nicaragua, y a todos los agricultores de nuestro país, que trabajan con honor, esfuerzo y dignidad, superando día a día los desafíos heredados y los que impone la realidad moderna de la agricultura.

A todas las personas que, de una u otra forma, fueron parte de este proceso y fuente de motivación: ¡gracias de corazón!

Deyvin Oward

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo, en primer lugar, a Dios, por concederme la paciencia, la sabiduría y la fortaleza necesarias para culminar este proceso académico y alcanzar uno de los anhelos más significativos de mi vida.

A mi madre, cuyo amor incondicional, constante apoyo y palabras de aliento fueron fundamentales para mantenerme firme en cada etapa de este camino. A mi hermana, abuelos y tíos, quienes con su respaldo y confianza han contribuido de manera invaluable a mi formación académica y personal.

Asimismo, dedico este esfuerzo a mi país, Nicaragua, tierra que me vio nacer y crecer, y a la cual deseo retribuir con el fruto de mis conocimientos y el compromiso de trabajar por su desarrollo y bienestar.

Finalmente, extendiendo esta dedicatoria a todas aquellas personas que, de una u otra forma, aportaron motivación, inspiración y compañía durante el desarrollo de este trabajo, siendo parte esencial de la consecución de este logro.

Andrés Antonio Pichardo

AGRADECIMIENTO

A Jehová Dios, mi guía y mi fortaleza, por haberme concedido el don de la vida, la salud, la sabiduría y la determinación para iniciar este sueño y llevarlo al cumplimiento.

A la maestra *Ana Victoria Borge Medina* por su incondicional apoyo moral, académico y profesional, y por las oportunidades que me brindó; las cuales me permitieron crecer no solo como profesional, sino también como persona y artista.

A Margelia Franco por ser una persona que siempre estuvo a disposición de apoyarme en momentos de incertidumbre, gracias por la confianza que me brindó en el seno de su hogar y su familia, por el respeto y estima que me ha dado.

A la Doctora Lilly Gómez por su infinito y especial cariño, por su estima y respeto. Agradezco profundamente su apoyo moral y económico, así como el honor de permitirme ser parte de su familia.

Al personal de Dirección de Gestión de la Calidad (DGC), por confiar en mí y brindarme el aliento necesario para asumir nuevos desafíos. Gracias a esta oportunidad, he podido adquirir competencias valiosas para mi desarrollo profesional.

Así mismo agradezco a los docentes de la Universidad Nacional Agraria (UNA), quienes han sido una fuente invaluable de mis conocimientos a lo largo de mi formación académica. En especial, quiero reconocer al MSc, Isaías Sánchez asesor de esta investigación, por motivarme y brindar todo su apoyo para la culminación exitosa de este trabajo.

A mi compañero de tesis, por depositar su voto de confianza y participar con su característica disposición y optimismo en esta investigación.

¡Infinita es mi gratitud!

Deyvin Oward

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por la vida, por la sabiduría, el entendimiento de ser mi guía, por darme la fortaleza en todo momento para seguir adelante en los momentos de debilidad.

A mi madre, Martha Alicia Pichardo Ruiz, y a mi hermana Javiera Pichardo, por su amor, apoyo en todo momento que la necesite, darme palabras acertadas para la toma de decisión y comprensión. Por todo ese amor incondicional de toda la vida.

Agradezco a mi familia, quienes a lo largo de toda mi vida académica me han apoyado, brindado consejos y ánimos para seguir creciendo como un profesional.

A mis amistades principalmente a Natalie Morales, a su madre, Tania Morales por el apoyo que me proporcionaron durante mis años de estudiante universitarios, gracias por los brillantes consejos y apoyo incondicional que me han brindado por tanto tiempo

En agradecimiento especial a Stephania Rodríguez por su apoyo emocional y moral durante el desarrollo de las actividades de esta investigación, por cada momento que estuvo sosteniendo los ánimos eterno agradecimiento.

Mi total gratitud a mi compañero de tesis Deyvin Oward, con quien cegado por la motivación y el deseo de superación culminamos nuestra investigación.

Así mismo a los docentes de la Universidad Nacional Agraria (UNA), por ser fuente de conocimientos a lo largo de mi aprendizaje y formación profesional, en especial, al docente MSc, Isaías Sánchez, tutor de la presente investigación, por su paciencia y brindar todo su apoyo para la culminación de estudio, al igual que agradezco a todos mis compañeros de estudio, con quienes forjé una gran amistad y con quienes disfruté de mis años como estudiante universitario. ¡Gracias por todo!

Andrés Antonio Pichardo

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
3.1 Generalidades de la papa	4
3.1.1 El cultivo de la papa	4
3.1.2 Morfología de la planta de la papa	4
3.1.3 Importancia económica de la papa	5
3.1.4 Marchitez bacteriana de la papa	6
3.2 Técnicas de diagnóstico de <i>Ralstonia solanacearum</i>	7
3.3 Anticuerpos policlonales como método de diagnóstico fitosanitario	8
3.4 Anticuerpos	8
3.5 Clasificación y clases de anticuerpos	9
3.6 Producción de anticuerpos a partir de conejos, <i>Oryctolagus cuniculus</i> L	9
3.7 Experimentación con animales en Nicaragua	10
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1 Ubicación y fecha del estudio	12
4.2 Diseño metodológico	12
4.3 Diseño experimental	13

4.3.1 Aislamiento de <i>Ralstonia solanacearum</i>	13
4.3.2 Identificación fenotípica y molecular de <i>R. solanacearum</i>	14
4.4 Especímenes para producción de anticuerpos	15
4.4.1 Características de los especímenes	15
4.5 Preparación del antígeno	16
4. 6 Inoculación en los conejos	17
4.7 Variables no sujetas a evaluación	18
4.8 Obtención del antisuero	19
4.10 Prueba de aglutinación en tejido vegetal	20
4.11 Variables evaluadas	21
4.12 Recolección de datos	21
4.13 Análisis de datos	22
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1 Identificación fenotípica y molecular de <i>R. solanacearum</i>	23
5.2 Producción y titulación de anticuerpos en conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i> L)	25
5.4 Determinación de validez de la prueba	27
VI. CONCLUSIÓN	29
VII. RECOMENDACIÓN	30
VIII. LITERATURA CONSULTADA	31
IX. ANEXOS	40

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Taxonomía de la papa	4
2.	Taxonomía de <i>Ralstonia</i>	6
3.	Características y diferencias entre los tipos de anticuerpos	9
4.	Tratamientos evaluados	13
5.	Esquema general de inmunización	17
6.	Esquema específico de inmunización	18

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Morfología de la planta de papa	5
2.	Ubicación del estudio	12
3.	Identificación fenotípica de <i>Ralstonia</i>	24
4.	Identificación molecular de <i>Ralstonia</i>	24
5.	Presencia y aglutinación de los anticuerpos	26
6.	Titulación de los anticuerpos	26
7.	Verificación de <i>Ralstonia</i>	28

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXOS	PÁGINA
1. Prueba T-Student, salida de Infostat	40
2. Colonia de <i>R. solanacearum</i> y programa de amplificación PCR	40
3. Electroforesis de <i>R.solanacearum</i> e inoculación del antígeno	40
4. Solución antígeno y almacenamiento del antisuero	41
5. Prueba de aglutinacion con anticuerpos en campo	41
6. Modelo de predicción	41

RESUMEN

Los anticuerpos son proteínas producidas por los linfocitos B de un organismo expuesto a cualquier antígeno. En medicina humana y veterinaria se usan para diagnóstico y tratamiento de enfermedades causadas por agentes biológicos y partículas no biológicas. En el ámbito de la Sanidad Vegetal, para detectar patógenos, los complejos métodos convencionales y modernos limitan su accesibilidad a los agricultores. Esta investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología Agrícola y Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria, sede central. El diseño experimental empleado fue semicuantitativo. El propósito fue evaluar la efectividad de Ac policlonales producidos en conejos blancos *Oryctolagus cuniculus* L, a partir de aislados de *Ralstonia solanacearum*, como una técnica de diagnóstico rápido y específico para este patógeno. Se extrajo plantas con síntomas de marchitez bacteriana y suelo para aislar el patógeno mediante test de flujo y dilución seriada. Se cultivó en medios de AN+TZC al 1%, a temperatura ambiente por 48 horas. La identificación del patógeno se realizó por pruebas bioquímicas, sensoriales y moleculares. El antígeno se preparó en formas pura y lisada. Se administró 1mL de antígeno por vía subcutánea en conejos adultos, durante 6 semanas. Cada semana se recolectó 2 ml de sangre; centrifugada para obtener el antisuero. Los datos se analizaron mediante la prueba de T de Student en Infostat. Los resultados mostraron concordancia entre la prueba de aglutinación y la PCR, sin diferencias significativas ($p > 0.05$). Estos hallazgos indican que los anticuerpos desarrollados presentan alta sensibilidad y especificidad, lo que sugiere su potencial como una herramienta accesible y eficiente para el diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* en condiciones de campo.

Palabras claves: anticuerpos policlonales, diagnóstico, aglutinación, conejos

ABSTRACT

Antibodies are proteins produced by the B lymphocytes of an organism exposed to any antigen. In human and veterinary medicine, they are used for the diagnosis and treatment of diseases caused by biological agents and non-biological particles. In the field of Plant Health, to detect pathogens complex conventional and modern methods limit their accessibility to farmers. This research was carried out in the laboratories of Agricultural Microbiology and Molecular Biology of the National Agrarian University, headquarters. The experimental design used was semi-quantitative. The purpose was to evaluate the effectiveness of polyclonal Ac produced in white rabbits *Oryctolagus cuniculus* L, from isolates of *Ralstonia solanacearum*, as a rapid and specific diagnostic technique for this pathogen. Plants with symptoms of bacterial wilt and soil were extracted to isolate the pathogen by flow test and serial dilution. It was cultured in 1% AN+TZC media at room temperature for 48 hours. Pathogen identification was performed by biochemical, sensory, and molecular testing. The antigen was prepared in pure and lysed forms. 1mL of antigen was administered subcutaneously in adult rabbits for 6 weeks. Each week 2 ml of blood was collected; centrifuged to obtain the antiserum. Data was analyzed using Student's T test in Infostat. The results showed agreement between the agglutination test and the PCR, with no significant differences ($p > 0.05$). These findings indicate that the antibodies developed have high sensitivity and specificity, suggesting their potential as an accessible and efficient tool for the diagnosis of *Ralstonia solanacearum* under field conditions.

Keywords: polyclonal antibodies, diagnosis, agglutination, rabbit

I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Rodríguez (2010) probablemente las primeras papas en cultivarse fueron alrededor de 4.000 y 8.000 años a.c. en la era Paleoindia, entre el sur de Perú y Bolivia al norte del lago Titicaca región de los andes. A partir de las especies silvestres *S. bukasovii*, *S. canasense* y *S. multisectum*, de la que se derivó *S. andígena*. Actualmente se conoce que la especie que se ha distribuido por todo el mundo es *S. tuberosum*, comenzando con la migración hacia Europa en el siglo XVI, la poliploidización sexual, hibridaciones interespecífica y varietal dio paso a la adaptabilidad y por consiguiente diversidad genética.

En la actualidad, la papa *S. tuberosum* L. se considera el tercer alimento más consumido en el mundo. Es un cultivo vital para la soberanía y seguridad alimentaria y, por sus atributos nutricionales y biológicos ha sido nombrado patrimonio agrícola de la humanidad. (Organización de las Naciones Unidas para Agricultura y la Alimentación [FAO, por sus siglas en inglés], (2024),

Hallazgos de Noroña y Tipanquiza (2010) estimaron que su consumo per cápita era de 50 kg por persona al año y superando los 300 millones de toneladas producidas en el mundo; no obstante, como ocurre con todos los cultivos este se ve perjudicado por plagas y enfermedades, siendo la marchitez bacteriana o podredumbre parda de la papa, causada por *Ralstonia solanacearum* una importante amenaza para su producción desde la sanidad hasta el rendimiento y la calidad del tubérculo. Debido a sus variantes, las razas de este patógeno son altamente resistentes y su capacidad de adaptación afecta no solo a la papa, sino a varios cultivos en todo el mundo.

De acuerdo con Saquicela et al. (2023) *R. solanacearum*, como agente causal de la marchitez bacteriana de la papa o de la podredumbre parda, constituye una enfermedad de gran importancia económica y sociocultural en el mundo y principalmente en las regiones andinas y mesoamericanas, ya que causa daños a todas las variedades de papa, siendo la principal enfermedad bacteriana que afecta este cultivo.

Estas bacterias colonizan los cultivos de papas y marchitan las plantaciones constituyendo así una de las enfermedades más resistentes por su alta capacidad de adaptación, diseminación y resistencia a los antibióticos. (Rivas, 2022).

De acuerdo con el (Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria [IPSA], 2024) en Nicaragua el estado fitosanitario de *R. solanacearum* se considera una plaga no cuarentenaria, pero de importancia económica, por lo que mantiene constante monitoreo debido a su potencial impacto en la producción agrícola. Esta relevancia justifica la búsqueda de métodos de diagnóstico más accesibles.

Como señalan Álvarez et al. (2008), existen diversas técnicas de diagnóstico para *R. solanacearum*, entre ellas métodos serológicos o enzimáticos (inmuno-florescencia e inmuno-captura) que detectan bajas concentraciones del patógeno. Sin embargo, también se emplean existen técnicas más sofisticadas como RT-PCR y electroforesis, si bien estos métodos ofrecen alta precisión, requieren tiempo, recursos y personal especializado, lo que incrementa su costo y limita su aplicación.

Cambra (2010) asegura que la evolución del diagnóstico fitosanitario ha transitado desde métodos clásicos como las pruebas de patogenicidad y microscopía electrónica, que presentaban problemas de especificidad y reacciones cruzadas; hacia técnicas modernas tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), electroforesis e hibridoma molecular, que superaban dichas dificultades. No obstante, estos métodos sofisticados presentan otros problemas de inaccesibilidad y calidad de los reactivos. Por ello, las pruebas serológicas, especialmente aquellas capaces de producir anticuerpos específicos, han revolucionado el análisis *in vitro* al ofrecer una alternativa más económica, además de reducir la probabilidad de reacciones cruzadas.

En este contexto, el propósito de la presente investigación es evaluar la efectividad de anticuerpos policlonales producidos en conejos blancos (*Oryctolagus cuniculus* L), a partir de aislados de *Ralstonia solanacearum*, como una técnica de diagnóstico rápido y específico para este patógeno; se pretende simplificar el proceso frente los métodos ya existentes y optimizar recursos en términos de tiempo, materiales tecnológicos, logísticos y profesional, contribuyendo así a mejorar el diagnóstico de *R. solanacearum* en el cultivo de papa.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar anticuerpos policlonales como herramienta de diagnóstico para identificar *Ralstonia solanacearum* agente causal de la marchitez bacteriana en el cultivo de la papa *Solanum tuberosum*.

2.2 Objetivos específicos

Estimular la producción de anticuerpos policlonales en conejos (*Oryctolagus cuniculus* L.) contra *Ralstonia solanacearum*, utilizando aislados previamente identificados.

Determinar la producción de anticuerpos contra *Ralstonia solanacearum* en conejo (*Oryctolagus cuniculus* L), mediante prueba de aglutinación y titulación de anticuerpos.

Evaluar con muestras de tejido de papa la validez de la prueba de aglutinación con anticuerpos policlonales frente a la prueba de referencia PCR.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Generalidades de la papa

Cuadro 1. Taxonomía de la papa

Reino	Viridiplantae
Filo	Estreptofitas
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanáceas
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>tuberosum</i> (Linnaeus, 1753)

3.1.1 El cultivo de la papa

Huamán (1986) afirma que la papa es una planta herbácea. Su hábito de crecimiento cambia entre las especies y dentro de cada especie, debido a que se ha determinado que la planta tiene un crecimiento arrosetado o semiarrosetado. Las especies *S. x juzepczukii*, *S. x curtilobum* y *S. x ajanhuiri* son capaces de adaptarse y producir en climas helados y entre otras especies usualmente su crecimiento es rastrero, decumbente, semierecto y erecto.

De acuerdo con Huarte y Capezio (2013) existen dos subespecies de papa, *S. tuberosum* y *S. andígena*. *S. andígena* se cultiva específicamente en las regiones entre Bolivia y Perú; mientras que *S. tuberosum* es la especie que se ha esparcido a nivel mundial. La planta de papa sufre de cinco estadios. I. Crecimiento del brote, II. Crecimiento vegetativo, III. Inicio de tuberización, IV. Llenado de los tubérculos y V. Maduración. Es una planta considerada termoperiódica, es decir, que necesita una variación entre la temperatura diurna y temperatura nocturna, requiriendo un periodo entre 8 a 12 horas diarias en temperatura de 10 °C a 20 °C.

3.1.2 Morfología de la planta de la papa

Como lo describe López (1982), la semilla tubérculo abre paso a la raíz la cual está formada por raíces adventicias fibrosas entre 3 a 5 en los brotes de los nudos subterráneos en lo que se forman tubérculos y estolones que son tallos subterráneos modificados. Los tubérculos son cortos y gruesos, mientras los estolones son largos y carnosos.

Los tallos aéreos son herbáceos y resultan de las yemas en los ojos de los tubérculos. Sus hojas son evidentemente compuestas, imparipinnadas en una planta adulta, sin embargo, en una planta emergente sus hojas son simples. Las flores son básicamente una cima, aunque en ciertos casos suele ser una umbela, usualmente nacen del tallo principal y son cubiertas por las hojas y la cantidad de flores depende de la especie y condiciones ecológicas.

Los frutos son bayas globulares, ovoides, esféricos o cónicas alargadas, su color puede ser verde pálido o intenso hasta rojizo. Su semilla se extrae de las bayas son pequeñas aplanadas ovales y generalmente amarillentas.

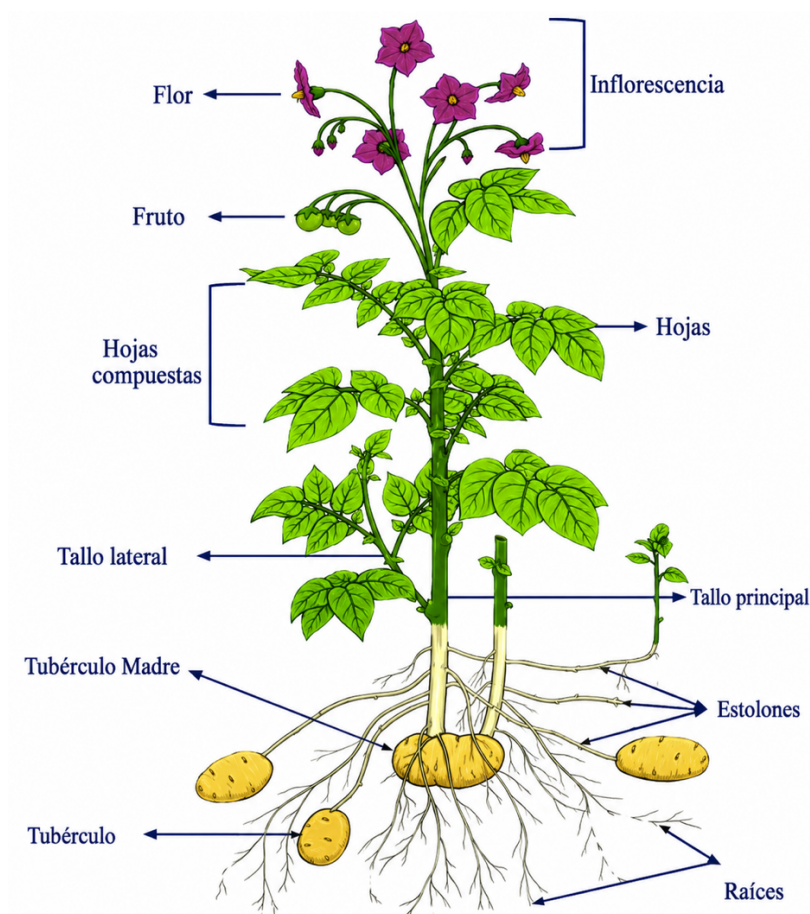


Figura. 1. Morfología de la planta de papa. Del (International Potato Center [CIP, por sus siglas en inglés] 2018), traducido por Deyvin-Oward.

3.1.3 Importancia económica de la papa

De acuerdo con la FAO (2024) en la actualidad es considerada como un cultivo vital y es el tercer alimento más consumido en el mundo, debido sus bondades nutricionales y a que requiere menos espacio-tierra para cultivarse. Se ha declarado patrimonio agrícola de la humanidad. Hoy

en día se ha procurado la diversidad genética como medio para conservar la papa, como pilar en la agricultura sostenible y garantizar la disponibilidad de alimentos, seguridad y soberanía alimentaria.

Según el Ministerio de Economía Familiar Comunitaria, Cooperativa y Asociativa (MEFCCA, 2022) en Nicaragua se cultivan aproximadamente 1,500 hectáreas de papa, lo que representa entre el 40% y 60% del abastecimiento a la demanda nacional, cultivándose en zonas con condiciones agroclimáticas que exige este cultivo, con alturas de 800 a 1,500 msnm, en los departamentos de Jinotega, Matagalpa, Madriz, Nueva Segovia y Estelí.

Estadísticas del Banco Central de Nicaragua (BCN, 2024), reportan hasta el primer semestre 2024 en cultivo de papa alcanzamos una producción de 1 millón 362,000 quintales, un crecimiento que representa el 2% con relación al año 2023, mientras que para el ciclo 2025 se proyecta 1.4 millones de quintales, para un aumento del 1.5% en la producción de este rubro.

3.1.4 Marchitez bacteriana de la papa

La marchitez bacteriana es una enfermedad vascular causada por *Ralstonia solanacearum*, un patógeno altamente destructivo que afecta a numerosos cultivos de importancia económica como tomate, chile, papa, y plantas ornamentales. La bacteria invade el xilema, donde se multiplica rápidamente, provocando obstrucción vascular, pérdida de turgencia y marchitez progresiva de la planta. En condiciones favorables la enfermedad puede avanzar de forma rápida y causar la muerte total de la planta (Hayward, 1991)

El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (CNIB, 2020) describe la clasificación taxonómica realizada por Smith. (1896), Ralston et al. (1973), Yabuuchi et al. (1992).

Cuadro 2. Taxonomía de *Ralstonia*

Clasificación taxonomía	
Reino	<u>Bacterias</u>
Filo	Pseudomonadota
Clase	Betaproteobacteria
Orden	Burkholderiales

Familia	Burkholderiaceae
Género	<i>Ralstonia</i>
Especie	<i>Ralstonia solanacearum</i>

De acuerdo con Álvarez et al. (2008) *R. solanacearum* fue descrita por Smith (1896) como *Bacillus solanacearum*, posteriormente se le denominó *Pseudomona solanacearum*, *Burkholderia solanacearum* y hasta la actualidad como *Ralstonia solanacearum*. Es una bacteria ilustre de suelo-fitopatógenas que ocasiona una enfermedad de marchitez y podredumbre en su amplio rango de plantas de la familia Solanáceas económicamente importantes, en las que causa daños severos hasta la muerte. De la clase β -proteobacterias consideradas un “complejo de especies”. Transmitida por el sustrato suelo y el agua ingresa a las raíces de las plantas, se dispersa a través del xilema, colapsa el huésped y regresa al ambiente.

Como lo mencionan (Buddenhagen y Kelman, 1964), las cepas de *Ralstonia solanacearum* divergen en cuanto a su rango de huéspedes, distribución geográfica, patogenicidad o virulencia, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas.

De acuerdo con Hayward (1991), la bacteria ataca más o menos 44 familias de plantas en regiones tropicales y subtropicales y 200 especies de plantas entre las de mayor importancia económica incluyen: tabaco, papa, musáceas, tomate, ají, berenjena, maní y varias plantas ornamentales.

3.2 Técnicas de diagnóstico de *Ralstonia solanacearum*

La Dirección General de Sanidad Vegetal - Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (2013), avala que existen diversas técnicas de detección de *R. solanacearum*, entre las más comunes están: el diagnóstico morfológico, reacciones bioquímicas, técnicas serológicas “Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima” (ELISA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Chavarro y Ángel (2006) manifiesta que debido a su difícil identificación se ha recurrido a técnicas de especificidad o diagnóstico molecular, siendo la (PCR) la óptima para la identificación de la bacteria mediante el uso de cebadores específicos, confirmando los resultados arrojados por ensayos inmunoenzimáticos.

3.3 Anticuerpos policlonales como método de diagnóstico fitosanitario

Rodríguez y Milenka (2005) realizó un análisis molecular de diversos aislados de (GFLV) agente causal del virus de hoja en abanico de la vid, en el cultivo de uva, como herramienta de detección de la proteína recombinante; o dicho de otro modo los Ac policlonales reconocen la proteína del agente causal de la enfermedad planteada. Para confirmar esta hipótesis, también realizaron pruebas de inmunocaptura a los Ac.

Por otro lado, Andrade (2012) utilizó la misma técnica de obtención de Ac policlonales. En dicho estudio se planteó el desarrollo de anticuerpos policlonales dirigidos al dominio RT de la proteína CP-RT codificada por el ARN2 del genoma viral. Con el designio de extender el nivel de herramientas para diagnosis del Virus Mop-Top de la papa (VMTP) en el estado de Colombia.

Mientras, Patiño et al. (2017) realizaron un estudio en *Agave tequilana* Weber var. Azul. Este cultivo es de importancia tanto para la cultura, como para la economía mexicana. El estudio se enfocó en la producción de anticuerpos policlonales contra *Fusarium* sp, como herramienta base para perfilar un método de diagnóstico relativamente rápido y directo ante otros métodos normalizados.

3.4 Anticuerpos

Los anticuerpos (Ac) son proteínas que circulan por la sangre y forman parte del sistema inmune. Cuando reconocen sustancias extrañas para el organismo, como los virus y las bacterias o sus toxinas las detectan y neutralizan. Una vez el cuerpo se ha expuesto a una sustancia foránea concreta, también llamada antígeno, los anticuerpos producidos para identificarlo y atacarlo persisten en la sangre, ofreciendo protección en el caso que a futuro se produzca nuevo contacto con el mismo antígeno. (National Human Genome Research Institute [NHGRI, por sus siglas en inglés], 2024).

Los anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Ig) son moléculas glico-proteicas (90% polipéptidos, 10% carbohidratos) que tienen la capacidad de combinarse específicamente con un antígeno o un inmunógeno. Reciben también el nombre de: anticuerpos, gammaglobulinas (debido a su

migración electroforética), antitoxinas, aglutininas o precipitinas (términos alusivos a su actividad). (Vega, 2009)

Suárez, (2020) y Machado et al. (2006) afirman que, los primeros anticuerpos (Ac) utilizados fueron los Ac policlonales, que fueron obtenidos del suero de animales previamente inmunizados. Los Ac, son proteínas producidas por los linfocitos b como secuela de la manifestación de sustancias intrusas denominadas antígenos. Estos anticuerpos reconocen y se unen a los antígenos para conseguir su posterior destrucción. (Ascoli, 2018)

3.5 Clasificación y clases de anticuerpos

Existen dos tipos principales de anticuerpos utilizados en inmunodiagnóstico: monoclonales y policlonales. Una diferencia relevante es que la producción de anticuerpos monoclonales requiere más tiempo y etapas experimentales complejas en comparación con los anticuerpos policlonales, que pueden obtenerse mediante procedimientos más rápidos y menos complejos (Talib et al. 2018).

Cuadro 3. Características y diferencias entre los dos tipos de anticuerpos

Ac policlonales	Ac monoclonales
Unión a diferentes epítomos	Unión a un solo epítomos
Diferente afinidad por los antígenos	Alta afinidad por los antígenos
Producidos distintos clones de linfocitos B	Producidos por el mismo clon de linfocitos B

Según Negroni, (2009), de acuerdo con la particularidad de sus cadenas pesadas, coeficiente de sedimentación, peso molecular y el contenido de hidratos de carbono, se catalogan cinco clases de inmunoglobulinas (Ig) nominadas también isotopos: IgG, IgA, IgE, IgD e IgM; del mismo modo, fueron descritos dos subclases de IgA de acorde a sus cadenas pesadas. (IgA1, IgA2) y cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4).

3.6 Producción de anticuerpos a partir de conejos, *Oryctolagus cuniculus* L

Tal como lo sugieren Arboleda et al. (2004), se debe disponer de un material biológico o huésped-anfitrión, la especie y raza es indiferente, pero es imperativo siempre considerar edad, peso y estado sanitario adecuado. Es importante realizar pruebas inmunológicas a partir de la

obtención del suero, antes de inocular el antígeno. La inoculación se aplica en vía intramuscular y se deposita en condiciones homogéneas.

Dunbar & Schwoebel (1990) afirman que se pueden utilizar conejillos de india, ratones, ratas, gallinas, ovejas y cabras; sin embargo, los conejos son los animales más empleados para la obtención de anticuerpos policlonales, esto se debe a su fácil manipulación y mantenimiento, responden diversos tipos de antígenos y generan en intervalos de cada semana cantidades adecuadas de antisuero.

3.7 Experimentación con animales en Nicaragua

En congruencia al marco legal, la Asamblea Nacional de Nicaragua (AN, 2011) en la Ley 747, Ley para protección y el bienestar de los animales domésticos y silvestres domesticados; en la sección VII de La Experimentación e Investigación, establece literalmente en los artículos siguientes:

Art. 42. El uso de animales domésticos o animales silvestres domesticados para experimento o investigación que se lleven a cabo con fines de estudios y avances de la ciencia, serán autorizados, siempre y cuando se demuestre que:

1. Los experimentos serán realizados bajo la supervisión de una institución de educación superior o de investigación reconocida oficialmente y que la persona que dirige el experimento cuente con los conocimientos y la acreditación necesaria.
2. Los resultados experimentales deseados no puedan obtenerse por otros procedimientos o alternativas.
3. Las experiencias sean necesarias para el control, prevención, diagnóstico o tratamiento de enfermedades que afecten al ser humano o al animal.
4. Los experimentos no puedan ser sustituidos por esquemas, dibujos, películas, fotografías, videocintas, materiales biológicos o cualquier otro procedimiento análogo.

Art. 43. Durante el proceso de investigación o experimentos se debe garantizar el bienestar del animal, y si por consecuencia de la investigación el animal sufriera enfermedad o lesión incurable, deberá aplicarse la eutanasia de inmediato conforme a los procedimientos establecidos por el reglamento de esta Ley.

1. Ningún estudiante podrá ser obligado a realizar prácticas que impliquen maltrato o crueldad con los animales.

Ninguna persona natural o jurídica puede vender o donar animales para que se realicen experimentos o investigación en ellos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación y fecha del estudio

El estudio se realizó en el periodo entre septiembre 2024 y noviembre 2025, en los laboratorios de Microbiología agrícola y Biología Molecular, adscritos a la Dirección de Ciencias Agrícolas de la Universidad Nacional Agraria. departamento de Managua, km 12.5 carretera panamericana norte, en las coordenadas 12° 08' 51.05" latitud norte y 86° 09' 50.69" longitud oeste. Los laboratorios están orientados a la academia y la investigación agrícola, brinda un servicio de diagnóstico de microorganismos de importancia económica y ambiental para especies agrícolas y forestales.

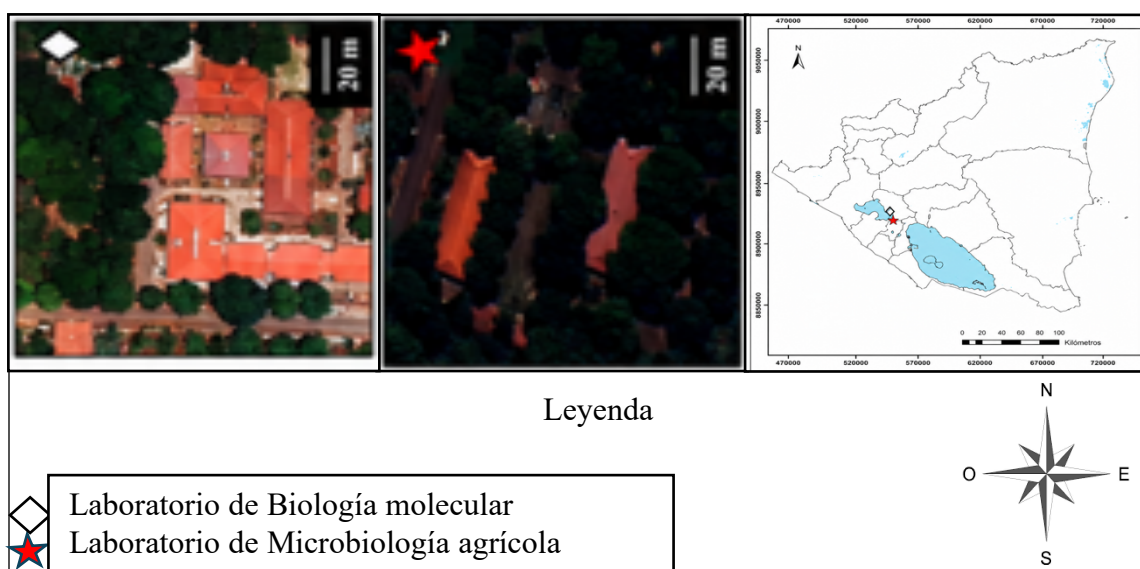


Figura 2. Ubicación del estudio. Fuente: Elaboración propia (2025).

4.2 Diseño metodológico

Esta investigación es de carácter experimental y presenta un enfoque semi-cuantitativo, de corte transversal y diseño descriptivo en concordancia con la tipografía planteada por Hernández et al. (2014).

4.3 Diseño experimental

La presente investigación se desarrolló mediante un diseño mixto, estructurado en dos fases:

Fase experimental, se realizó bajo un diseño experimental comparativo donde se emplearon 2 tratamientos o esquemas de inmunización a partir de aislados de *R. solanacearum*, en dos especímenes distintos con; (1) Bacteria pura/conejo macho y (2) bacterias sensibilizadas/ coneja hembra para la producción de anticuerpos policlonales donde

Fase de evaluación diagnóstica, orientada a determinar la capacidad de detección de dichos anticuerpos en muestras de papa, en comparación con un método de referencia.”

Cuadro 4. Tratamientos evaluados

Tratamiento	Tipo de antígeno	Sexo del inmunoreactor
T1	Bp	Mx
T2	Bs	Hx

Bp: Bacteria pura; Bs: Bacteria sensibilizadas; Mx: Macho; Hx: Hembra

4.3.1 Aislamiento de *Ralstonia solanacearum*

Se realizó de extracciones de plantas que presentaban los síntomas característicos de marchitez bacteriana en campo y a partir de muestras de suelo donde estuvieron las mismas plantas.

Aislamiento a partir de tejido vegetal.

A partir de tallos de plantas de papa que presentaban síntomas de marchitez bacteriana, se realizaron cortes longitudinales de entre 2 y 5 cm utilizando un bisturí número 23. Posteriormente, los fragmentos se sumergieron en un volumen de 5 a 10 ml de agua destilada estéril, con el fin de liberar las células bacterianas (Calvo, 2005; Medina-Gómez, 2020).

El flujo bacteriano obtenido se sembró mediante estriado en placas Petri que contenían el medio de cultivo semiselectivo cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 1 % (TZC 1 %). Las placas fueron incubadas a una temperatura de 28 a 30 °C y evaluadas tras un periodo de 24 a 48 horas.

Se seleccionaron las colonias con características típicas de *R. solanacearum*, las cuales presentan un fenotipo distintivo, caracterizado por colonias de aspecto acuoso y con un centro de color rojizo en el medio TZC al 1 %. Estas características facilitan su identificación preliminar (Barrios, 2011; Fornos et al. 2021).

Aislamiento a partir de muestra de suelo.

La recolección de muestras de suelo se llevó a cabo en áreas donde las plantas presentaban síntomas de marchitez bacteriana, lo que incrementa la probabilidad de detectar *R. solanacearum*. El muestreo se realizó como referencia de Fornos et al. (2021) que consiste en extraer suelo de la rizosfera, a una profundidad de entre 10 y 20 cm, utilizando herramientas previamente desinfectadas para evitar la contaminación cruzada, debido a que el patógeno tiende a concentrarse en suelos húmedos y con incidencias. Las submuestras recolectadas se homogenizaron para obtener una muestra heterogénea y posteriormente se almacenaron en bolsas estériles.

Para el procesamiento de las muestras, se pesaron 10 g de suelo, los cuales se suspendieron en 90 ml de agua estéril, manteniendo una proporción 1:9. Este procedimiento facilitó la liberación del patógeno adherido a los agregados del suelo, tal como lo señalan Medina-Gómez (2020). La suspensión obtenida sirvió como base para la preparación de diluciones seriadas.

A partir de la suspensión inicial (10^{-1}), se prepararon diluciones sucesivas de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , siguiendo metodologías comúnmente empleadas en estudios de bacterias del suelo. Este enfoque resulta útil para el aislamiento de *R. solanacearum*, ya que reduce la interferencia de microorganismos acompañantes (Gutiérrez, 2012).

Finalmente, a partir de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} se sembraron alícuotas de 100 μ l mediante extensión en placas Petri, utilizando un asa de Drigalsky estéril. Las colonias sospechosas fueron posteriormente purificadas mediante resiembra y sometidas a pruebas bioquímicas, fisiológicas y moleculares para confirmar su identidad (Corea-Narváez et al. 2024)

4.3.2 Identificación fenotípica y molecular de *R. solanacearum*

Se realizaron diversas pruebas fisiológicas y bioquímicas con el propósito de confirmar la presencia de *R. solanacearum* en las colonias previamente aisladas. Entre estas se incluyeron ensayos bioquímicos orientados a determinar características metabólicas asociadas al patógeno, tales como la actividad oxidasa, la hidrólisis de compuestos, la producción de pigmentos característicos y la utilización de azúcares y alcoholes. Estos procedimientos son ampliamente

empleados para la diferenciación de especies dentro del género *Ralstonia* (Hayward, 1991; Prior & Fegan, 2015). Los resultados obtenidos permitieron establecer la biovar correspondiente.

Adicionalmente, se llevaron a cabo pruebas fisiológicas, específicamente la prueba de hipersensibilidad (HR) en plantas no hospederas, las cuales fueron inoculadas y monitoreadas en condiciones de invernadero en la UNA. Esta prueba es fundamental para verificar la capacidad patogénica del aislado, ya que permite evidenciar una respuesta típica de bacterias fitopatógenas. La aparición rápida de necrosis en las hojas infiltradas constituye un indicador clave, descrito en estudios clásicos y corroborado por investigaciones recientes en bacterias vasculares (Klement et al. 1990; Mansfield et al. 2012). Esta reacción refuerza la evidencia fenotípica de que las colonias evaluadas corresponden a un fitopatógeno capaz de activar mecanismos de defensa en las plantas y permitió determinar la raza del patógeno.

Posteriormente, la identidad de los aislamientos fue confirmada mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El ADN genómico se extrajo utilizando el método de lisis celular física descrito por Ren et al. (2007) y Islam et al. (2017). Se amplificaron regiones génicas específicas mediante la aplicación de protocolos estandarizados para el diagnóstico de *R. solanacearum* y otras bacterias vasculares (Opina et al. 1997; Fegan y Prior, 2005).

Finalmente, los productos de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, con el fin de determinar la presencia del material genético de *R. solanacearum* (Cellier et al. 2012; Elphinstone, 2005).

4.4 Especímenes para producción de anticuerpos

4.4.1 Características de los especímenes

Se seleccionaron dos conejos (*Oryctolagus cuniculus* L), una hembra y un macho, con una edad mínima de un año y un peso aproximado de 12 libras cada uno, con el fin de asegurar la madurez fisiológica y reducir la variabilidad asociada al crecimiento. La inclusión de ambos sexos, así como la homogeneidad en edad y peso, facilita la comparación de las respuestas inmunológicas entre los individuos y disminuye posibles sesgos derivados de estas variables (National Research Council, 2011). Previo al inicio de los procedimientos experimentales, los animales fueron sometidos a una evaluación sanitaria integral realizada por un médico veterinario, con el

objetivo de confirmar su estado clínico y aptitud para el estudio. Dicha evaluación incluyó la valoración del apetito, comportamiento, mucosas, frecuencia respiratoria, temperatura y peso corporal (Percie du Sert et al. 2020).

El protocolo de manejo y monitoreo clínico se ajustó a directrices internacionales de bienestar animal. Para ello, se establecieron criterios de evaluación y un sistema de puntuación clínica orientado al registro de signos como pérdida de peso superior al 10 %, apatía, disminución en el consumo de alimento o agua, alteraciones en la postura o locomoción, temperatura corporal anormal y manifestaciones locales en el sitio de inoculación, tales como enrojecimiento, inflamación o supuración. Canadian Council on Animal Care (2022)

Las observaciones clínicas se realizaron en tres fases: (a) una fase previa, entre 24 y 72 horas antes del procedimiento, con el fin de establecer una línea base; (b) una fase aguda, con monitoreos cada 30 a 60 minutos durante las primeras cuatro horas posteriores a la inoculación, y posteriormente cada 4 a 8 horas según la estabilidad del animal; y (c) una fase posterior, con evaluaciones diarias hasta la resolución del cuadro o hasta alcanzar el punto de término experimental. Este esquema de monitoreo y los criterios de intervención se alínean con las recomendaciones internacionales para la definición de límites humanitarios y protocolos de vigilancia en modelos de infección e inoculación. Stokes (2002)

4.5 Preparación del antígeno

Para la preparación del antígeno, se empleó *R. solanacearum* biovar 1, raza 3, previamente identificado con el mayor grado de pureza posible. Se prepararon viales estériles de 2 ml que contenían una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9 % p/v, utilizada únicamente como vehículo del antígeno y no como adyuvante (Gómez y Ríos, 2024; Patel et al. 2025).

El antígeno se obtuvo mediante dos esquemas experimentales. En ambos casos, se utilizó el mismo volumen de solución salina para diluir dos muestras provenientes de colonias puras, las cuales fueron previamente homogenizadas, con el fin de obtener dos suspensiones iniciales equivalentes.

Una de las suspensiones fue sometida a un proceso de lisis celular mediante calentamiento a 70 °C durante 10 minutos, mientras que la otra se mantuvo sin tratamiento térmico. De esta manera, se generaron dos tipos de preparaciones: una constituida por bacterias intactas y otra por células lisadas o sensibilizadas, que contenían componentes intracelulares expuestos, tales como material genético y proteínas. Este enfoque permitió comparar cuál de las dos variantes resultaba más adecuada como antígeno para la inducción de la respuesta inmune. El procedimiento de preparación se repitió antes de cada inoculación, con el objetivo de asegurar la frescura del antígeno y, en consecuencia, su efectividad (Lomonte, 2007)

Cuadro 5. Esquema general de inmunización

Esquema	Dosis	Distribución de dosis	Inmunoreactor
6 semanas			
Antígeno puro	1 mL	Constante	Macho
Células lisadas	1 mL	Constante	Hembra

4. 6 Inoculación en los conejos

Una vez formulada la solución antigénica, se procedió a realizar la primera inoculación, administrando una dosis de 1 mL por vía subcutánea. Posteriormente, los animales fueron mantenidos en condiciones homogéneas en cuanto a alimentación, manejo y cuidado, permaneciendo en cautiverio doméstico y vigilancia. Bajo estas mismas condiciones, se realizaron cinco inoculaciones de refuerzo, manteniendo dosis constantes, con el objetivo de inducir y potenciar la producción de los anticuerpos.

Los antígenos utilizados se obtuvieron a partir de cultivos puros en medio agar nutritivo, en fase exponencial de crecimiento (3–5 días), bajo condiciones de incubación a 30 °C. La concentración celular se estimó mediante la escala de turbidez de McFarland 0,5, con el fin de estandarizar la carga bacteriana empleada en cada inoculación.

Se aplicaron dos esquemas de inmunización basados en las preparaciones antigénicas (bacterias intactas y lisadas), los cuales fueron administrados en ambos especímenes. El protocolo, adaptado del propuesto por el Subcomité Taxonómico de *Leptospira* (TSCL) de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología, González et al. (2002) tuvo una duración de seis

semanas. El protocolo consiste en la administración vía subcutánea de cinco dosis de 1 mL a intervalos semanales, seguida de una dosis de refuerzo de 0,5 mL, aplicada 15 días después de la quinta inoculación, utilizando del mismo modo el antígeno vivo y el lisado. Complementariamente se utilizó la escala al 0.5 del nivel de turbidez de McFarlan para calcular la concentración bacteriana.

Cuadro 6. Esquema específico de inmunización

Día	Bacteria intacta	Bacteria lisada
1	1 ml	1 ml
7	1 ml	1 ml
14	1 ml	1 ml
21	1 ml	1 ml
28	1 ml	1 ml
Refuerzos quincenales	0.5 ml	0.5 ml

4.7 Variables no sujetas a evaluación

El manejo de los conejos durante el proceso de inmunización se llevó a cabo en cautiverio doméstico, siguiendo estrictamente protocolos de bienestar animal y bioseguridad. Se garantizaron condiciones adecuadas de alojamiento, con acceso a alimentación balanceada y agua potable ad libitum, así como un ambiente controlado en términos de temperatura, humedad y ciclo de luz.

Los animales, previamente seleccionados con base en su estado de salud, edad y peso homogéneo, fueron sometidos a un período de aclimatación antes del inicio del estudio. Durante el proceso de inmunización, se realizó un monitoreo continuo de su estado clínico, peso corporal, consumo de alimento y posibles reacciones adversas. En caso de ser necesario, se implementaron medidas analgésicas o, en situaciones críticas, la eutanasia humanitaria conforme a los lineamientos establecidos.

Adicionalmente, se realizaron análisis hematológicos completos (BHC) con el objetivo de evaluar y dar seguimiento al estado de salud de los especímenes. Estos controles fueron complementados con evaluaciones periódicas realizadas por un médico veterinario.

La alimentación de los animales consistió en una dieta balanceada basada en pienso, que incluía heno, granos de avena y cebada, semillas de girasol, harina de soja y suplementos de vitaminas y minerales. Asimismo, se complementó con el suministro regular de verduras y frutas frescas, tales como apio, lechuga, lechuga romana, repollo, zanahoria, manzana verde, perejil y culantro, con el fin de asegurar un adecuado aporte nutricional.

4.8 Obtención del antisuero

Se empleó el método descrito por Arboleda et al. (2004). Transcurridos los días posteriores a la inoculación, los conejos fueron inmovilizados adecuadamente de manera mecánica con el fin de realizar la extracción de sangre. Se identificaron venas con buena irrigación, las cuales fueron desinfectadas cuidadosamente con etanol al 70% antes y después del procedimiento.

Posteriormente, se procedió a la punción venosa utilizando cánulas de vidrio estériles, recolectando un volumen mínimo de 2 mL de sangre en frascos estériles. La sangre obtenida fue sometida a centrifugación a 3.500 rpm durante 5 minutos, con el objetivo de separar el suero.

El antisuero resultante se distribuyó en alícuotas y se almacenó a 10 °C hasta su posterior utilización. De esta manera, se obtuvieron anticuerpos policlonales específicos contra *R. solanacearum* (AntiRS)

4.9 Titulación de los anticuerpos

Se modificó levemente el procedimiento planteado por (Coll-Morales, 1993) donde aplica el macro método de la titulación bidimensional, mediante la técnica de aglutinación que consiste en realizar una dilución seriada de los anticuerpos, las cuales son validadas a una concentración gradiente del antígeno hasta determinar la zona o concentración de equivalencia de los anticuerpo-antígeno.

Se empleó la técnica de espectrofotometría para medir la absorbancia (ABS), es decir, la cantidad de luz absorbida por la solución compuesta por Rosa de Bengala + *R. solanacearum*. Este análisis permitió determinar la longitud de onda óptima y estimar la concentración del antígeno, asegurando que la solución presentara valores adecuados y evitando concentraciones excesivamente bajas o saturadas del soluto (Vargas-Hernández & Vidal, 2014).

Para la titulación de los anticuerpos, se prepararon diez tubos de ensayo estériles, en cada uno de los cuales se añadieron 100 μ L de solución de NaCl al 0,9 %. Posteriormente, se incorporaron 100 μ L de antisuero (Anti-RS) y se realizaron diluciones seriadas sucesivas. Este procedimiento permitió evaluar la concentración de los anticuerpos obtenidos a partir de antígenos provenientes tanto de células intactas como lisadas.

Las mezclas se incubaron durante aproximadamente 3 minutos, tiempo en el cual ocurre la interacción antígeno-anticuerpo, permitiendo así la posterior evaluación de la respuesta inmunológica.

4.10 Prueba de aglutinación en tejido vegetal

En condiciones de campo y laboratorio, se empleó una suspensión coloreada con Rosa de Bengala al 1 % como partícula inerte, con el fin de facilitar la visualización de la aglutinación bacteriana. De acuerdo con el inserto técnico del reactivo Rosa de Bengala, la suspensión bacteriana teñida permite la unión de anticuerpos tipo IgG o IgM, favoreciendo la formación de agregados visibles tras el proceso de aglutinación (Spinreact, 2023). Este principio es análogo al utilizado en pruebas serológicas para brucelosis, en las cuales células de *Brucella* sp inactivadas y teñidas con Rosa de Bengala incrementan la visibilidad de la reacción (Ruíz-Meza et al. 2005).

Durante el procesamiento de la muestra vegetal (tallo), el tejido fue lavado y triturado con el objetivo de liberar las bacterias presentes en su interior. Posteriormente, el material se maceró en una solución de Rosa de Bengala al 1%, lo que permitió la tinción de las bacterias por difusión en el medio líquido. Este proceso favorece la formación de complejos antígeno-anticuerpo durante la prueba de aglutinación, incrementando la sensibilidad en la detección.

Una vez obtenida la alícuota teñida, esta se mezcló directamente con los anticuerpos específicos y se sometió a un periodo de incubación. La agitación controlada, ya sea mediante un agitador (4 minutos a 80–100 rpm) o mediante movimiento circular manual, resultó fundamental para favorecer la formación de agregados sin inducir falsos positivos, conforme a los protocolos establecidos para pruebas con Rosa de Bengala (Spinreact, 2023).

Durante la fase de lectura, los agregados teñidos se identificaron visualmente como grumos, lo que indica una reacción positiva de aglutinación. En contraste, la presencia de una suspensión homogénea se interpretó como un resultado negativo, al no evidenciarse la formación de complejos visibles antígeno-anticuerpo.

4.11 Variables evaluadas

Inducción de producción de anticuerpos policlonales: Consiste en inmunizar al animal huésped *Oryctolagus cuniculus* L, con el antígeno “*Ralstonia solanacearum*” lo cual desencadena un efecto inmunitario adquirido, que trasciende en la generación de una amalgama heterogénea de anticuerpos. Estos son mensurados mediante técnicas serológicas utilizando el método ELISA. (National Institutes of Health [NIH, por sus siglas en inglés], 2024)

Titulación de los anticuerpos policlonales en tejido vegetal: Es un procedimiento analítico-cuantitativo basado en una reacción química que permite determinar la concentración de la inmunoglobulina presente en una muestra. Es una técnica de medición de nivel o cantidad que se puede determinar en una concentración de la inmunoglobulina mediante reacciones químicas y se caracteriza por ser un procedimiento analítico-cuantitativo.

Presencia de *Ralstonia solanacearum*: Se realizará mediante la técnica de aglutinación; ésta es una técnica de biología molecular que permite identificar las biomoléculas expresadas en proteínas o ácidos nucleicos ya sean de ADN o ARN.

Validez de la prueba: Se determinará mediante la estimación de sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica, a partir de valores predictivos en una tabla de contingencia.

4.12 Recolección de datos

Los datos obtenidos en cada etapa del experimento se registraron de forma sistemática en una bitácora de laboratorio, con el fin de asegurar la trazabilidad del proceso y documentar posibles variaciones. La información cuantitativa se organizó en una hoja de cálculo en Excel (versión 365) Corporación Microsoft (2021) donde se estructuraron y depuraron los datos incluyendo las observaciones de cada ensayo, la fecha de registro, el lote de antígeno y la identificación del espécimen, asegurando el control de calidad experimental.

Posteriormente, se analizaron los resultados de aglutinación (positivos y negativos) obtenidos en las pruebas serológicas y se compararon con la prueba de referencia, la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta comparación permitió evaluar la concordancia entre ambos métodos, así como la sensibilidad y especificidad relativa del antisuero.

4.13 Análisis de datos

Los datos fueron procesados en el software de (Di Rienzo et al. 2020). Se evaluaron los resultados obtenidos de ambas técnicas AntiRS vs PCR, mediante la prueba planteada por (Student, 1908) para muestras pareadas permitiendo comparar sus medias. La normalidad se verificó mediante la función Kolmogorov-Smirnov.

Adicionalmente, en Microsoft Corporación, (2021) versión 365 se realizó un análisis complementario mediante gráficas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación fenotípica y molecular de *R. solanacearum*

R. solanacearum presentó en medio TZC al 1% colonias fluidas de color blanco crema con centros rosados, características asociadas a aislamientos virulentos de la bacteria, coincidiendo con lo descrito por Buddenhagen y Kelman (1954) y Hayward (1991), quienes señalan esta morfología como un criterio fenotípico clásico para la identificación preliminar del patógeno. La identificación del biovar 1 mediante pruebas bioquímicas evidenció incapacidad para metabolizar disacáridos y hexosas alcohólicas, (figura 3) comportamiento fisiológico asociado a aislados tropicales del cultivo de papa.

Estos resultados coinciden con Fornos et al. (2021), quienes identificaron el biovar 1 de *R. solanacearum* mediante pruebas de oxidación y fermentación utilizando tres disacáridos y tres hexosas alcohólicas, observando reacciones negativas similares a las obtenidas en este estudio. De igual manera, Díaz (2005) reportó la presencia de razas y biovares de *R. solanacearum* en zonas paperas de Jinotega, Matagalpa, Estelí y Rivas, evidenciando la amplia distribución del patógeno en Nicaragua.

En la caracterización de razas mediante inoculación en *Nicotiana tabacum* se observó clorosis a los dos días y marchitamiento progresivo entre los 7 y 8 días después de la inoculación, respuesta compatible con la raza 1 de *R. solanacearum*. Ríos-Morales (2007) señala que las pruebas de hipersensibilidad en tabaco constituyen un indicador confiable para diferenciar cepas virulentas, debido a que la rapidez e intensidad de los síntomas reflejan la actividad de efectores tipo III involucrados en la inducción de respuestas defensivas en las plantas.

Los aislados bacterianos identificados fenotípicamente como *R. solanacearum* fueron confirmados mediante PCR, observándose amplicones de aproximadamente 280 pb, (figura 4) tamaño esperado para la identificación molecular del patógeno. La confirmación molecular permitió validar la identidad de los aislados previamente caracterizados por pruebas bioquímicas y de patogenicidad, incrementando la confiabilidad diagnóstica del estudio. Estos resultados respaldan la importancia de combinar metodologías fenotípicas y moleculares para reducir posibles errores de identificación, especialmente en investigaciones orientadas a la producción

de anticuerpos policlonales, donde la especificidad antigénica del patógeno constituye un factor determinante para la sensibilidad y precisión de las pruebas de aglutinación.



Figura 3. Identificación fenotípica de *R. solanacearum*. Colonias de *Ralstonia solanacearum* en medio TZC1% (A), Plántula de tabaco con síntomas de clorosis y marchitamiento (B) y Prueba de oxidación-fermentación de azúcares (C).

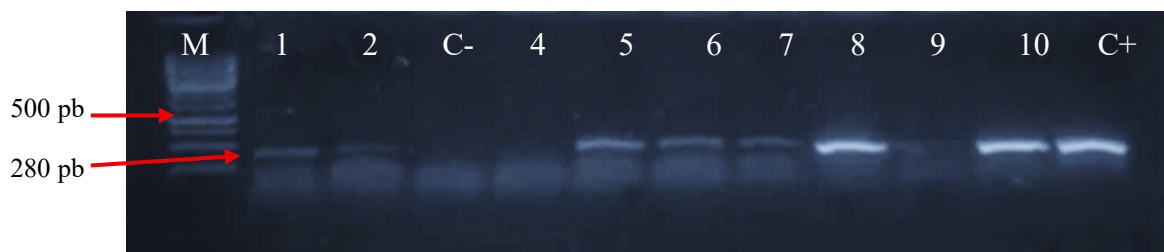


Figura 4. Identificación molecular de *R. solanacearum* mediante técnica PCR. M: Marcador de peso molecular 1kb; 1,2,5,6,7,8,9 y 10; muestras positivas para *R. solanacearum*; C-: Control negativo, 4: Muestra control negativo; C+: Control positivo.

Fornos et al. (2021) describen resultados similares a este estudio, en los que utilizaron 3 disacáridos y 3 hexosas que mediante la reacción oxidación y fermentación resultaron ser negativas, lo que indica que identificaron biovar 1 en sus aislados de *R. solanacearum*. Díaz, (2005) caracterizó la estructura poblacional de *R. solanacearum* a través de la identificación fenotípica de biovars y razas en los departamentos de Jinotega, Matagalpa y Estelí, en la región norte y Rivas, en el pacífico de Nicaragua.

Ríos -Morales (2007), manifiesta que la prueba de hipersensibilidad realizada en plantas de *Nicotiana tabacum* permite diferenciar la virulencia de cepas y constituye un indicador confiable de compatibilidad/incompatibilidad en hospederos no naturales, además menciona

que la intensidad y velocidad de la hipersensibilidad reflejan indirectamente la funcionalidad del repertorio de efectores tipo III del patógeno, que es la inducción de respuestas defensivas en las plantas.

5.2 Producción y titulación de anticuerpos en conejos (*Oryctolagus cuniculus* L)

La producción de anticuerpos policlonales en los especímenes macho y hembra de *Oryctolagus cuniculus* fue confirmada mediante reacciones de aglutinación observadas durante la interacción entre el suero inmunizado y células de *R. solanacearum* (Figura 5). La formación de agregados visibles evidenció la capacidad de reconocimiento antigénico de los anticuerpos generados.

Los títulos de los Ac alcanzaron diluciones de hasta 1:256 en ambos especímenes (Figura 6), indicando una elevada afinidad de unión frente al patógeno. No obstante, los Ac obtenidos a partir de inmunizaciones con bacterias intactas reaccionan más rápido. Este comportamiento se atribuye a la conservación de la arquitectura tridimensional de los epítomos en células bacterianas íntegras, condición que favorece la inducción de anticuerpos con mayor especificidad durante la respuesta humoral, tal como describe Van Regenmortel (1996). En contraste, Kudlacek et al. (2020) señalan que la lisis celular altera la conformación estructural de proteínas antigénicas y reducen la eficiencia del reconocimiento inmunológico.

La mayor nitidez observada en los anticuerpos obtenidos del conejo macho inmunizado con bacterias intactas sugiere que el tipo de inmunógeno ejerció una influencia más determinante que el sexo del animal. Estos resultados coinciden con Bachmann y Zinkernagel (1997) y Del Giudice et al. (2018), quienes sostienen que la integridad estructural de los antígenos constituye un factor clave para inducir respuestas humorales más robustas y detectables, debido a la adecuada conservación de epítomos y a una interacción más eficiente con el sistema inmunitario. En este sentido, las diferencias observadas entre tratamientos parecen estar asociadas principalmente a la calidad antigénica del inóculo y no necesariamente a factores biológicos inherentes al sexo de los especímenes evaluados.

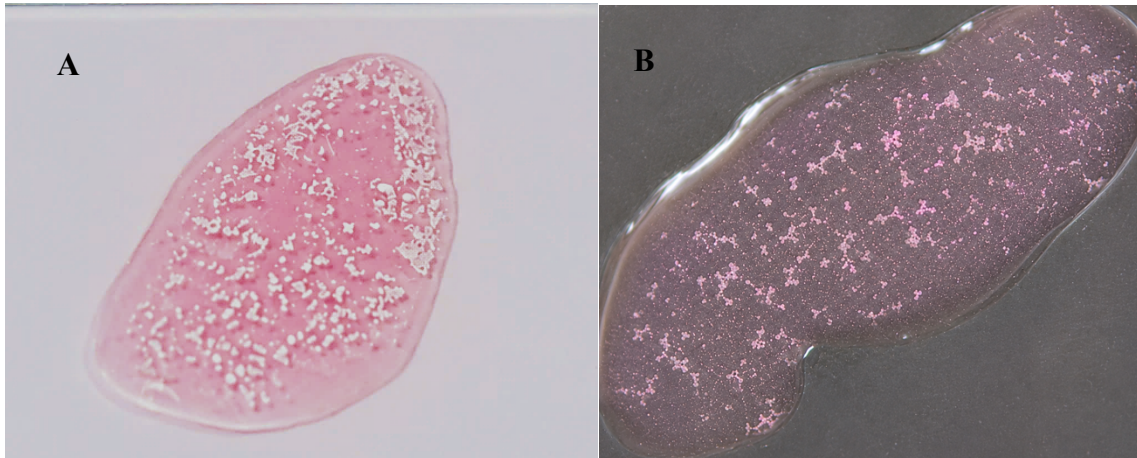


Figura 5. Formación de complejos anticuerpos-antígeno (Aglutinación) (A) Antisuero hembra y (B) Antisuero macho.

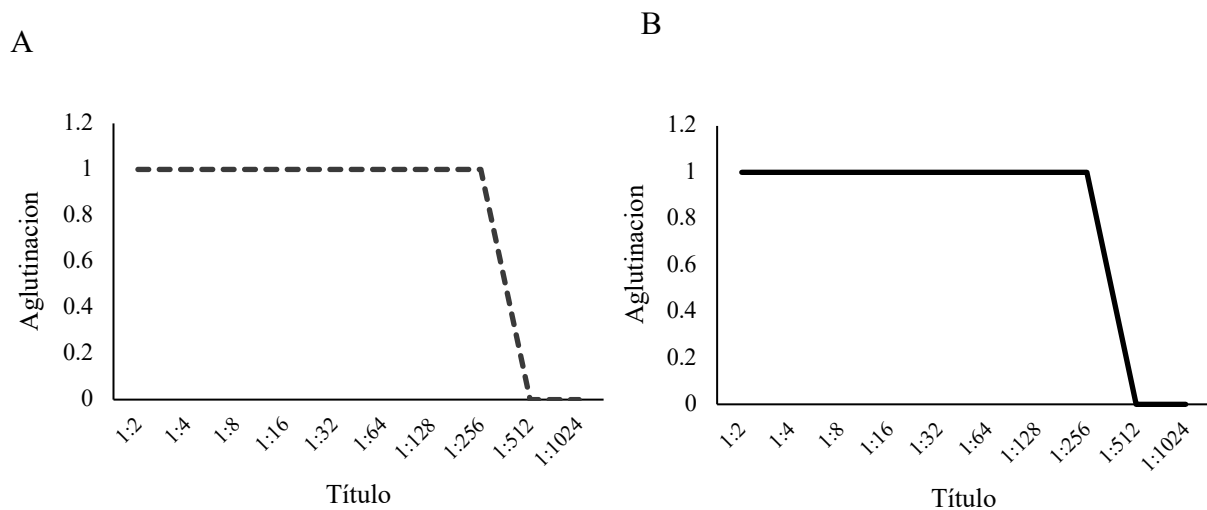


Figura 6. Titulación de anticuerpos policlonales (AntiRS) frente a *R. solanacearum*. Título de anticuerpos con células bacterianas sin atenuar (A) y título de anticuerpos con células bacterianas lisadas (B).

Los resultados obtenidos confirman que la producción de anticuerpos policlonales en conejos constituye una estrategia ampliamente utilizada en inmunología y diagnóstico serológico, debido a la capacidad de esta especie para generar respuestas humorales robustas y títulos elevados de inmunoglobulina G (IgG) tras la inmunización con antígenos específicos. Zhao et al. (2017) y Wang et al. (2019) señalan que los conejos desarrollan respuestas inmunológicas detectables y reproducibles, favoreciendo su aplicación en pruebas serológicas basadas en anticuerpos.

Aunque en este estudio el conejo macho presentó una reacción de aglutinación más definida, las gráficas de titulación mostraron comportamientos similares entre ambos tratamientos, alcanzando diluciones de hasta 1:256. Smith et al. (2019) reportan que no existen diferencias consistentes entre machos y hembras en la producción de anticuerpos policlonales, por lo que las variaciones observadas probablemente responden a factores individuales y a la calidad antigénica del inmunógeno más que al sexo del animal.

Asimismo, la producción de antiseros puede verse influenciada por factores fisiológicos y metodológicos, incluyendo metabolismo, adyuvantes y técnicas de purificación empleadas. Leenaars y Hendriksen (2005) y Nakasamawa et al. (2016) destacan que estas variables pueden modificar la intensidad y duración de la respuesta inmunológica, razón por la cual recomiendan estandarizar las condiciones experimentales para garantizar mayor reproducibilidad. En este contexto, las diluciones obtenidas permitieron establecer el límite de detección de los anticuerpos, aunque sus resultados deben interpretarse considerando la variabilidad biológica inherente al proceso inmunológico.

5.4 Determinación de validez de la prueba

La prueba antiRS mostró alta concordancia ante la prueba de referencia PCR convencional para la detección de *R. solanacearum* en tejido vegetal de papa. De las 30 muestras analizadas, 28 resultaron positivas y dos negativas en ambas metodologías, obteniéndose valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del 100%. Asimismo, la ausencia de diferencias significativas entre técnicas ($P = 0.1608$) sugiere que los anticuerpos policlonales desarrollados poseen elevada afinidad y capacidad de reconocimiento frente al patógeno, permitiendo resultados comparables con la técnica molecular empleada.

La amplificación de fragmentos de aproximadamente 280 pb mediante PCR confirmó molecularmente la presencia de *R. solanacearum* en las muestras evaluadas, respaldando los resultados obtenidos mediante la prueba de aglutinación. La coincidencia entre ambas técnicas evidencia que el antisuero producido fue capaz de reconocer antígenos bacterianos de manera específica y consistente. En este sentido, Gallo, Marín y Gutiérrez (2012) señalan que la especificidad inmunológica depende de la interacción entre las regiones variables de los

anticuerpos y epítomos antigénicos conservados o especie-específicos presentes en el patógeno, permitiendo respuestas serológicas positivas altamente precisas.

Los resultados obtenidos sugieren que la prueba antiRS posee potencial como herramienta de diagnóstico rápido para la detección de *R. solanacearum*, especialmente bajo condiciones donde las técnicas moleculares requieren mayor infraestructura y costos operativos. Aunque los valores diagnósticos obtenidos fueron elevados, es importante considerar que la respuesta serológica puede verse influenciada por factores biológicos y metodológicos asociados a la producción de antisueros, por lo que se recomienda ampliar el número de muestras y evaluar distintos aislamientos bacterianos para fortalecer la validación diagnóstica del antisuero desarrollado.

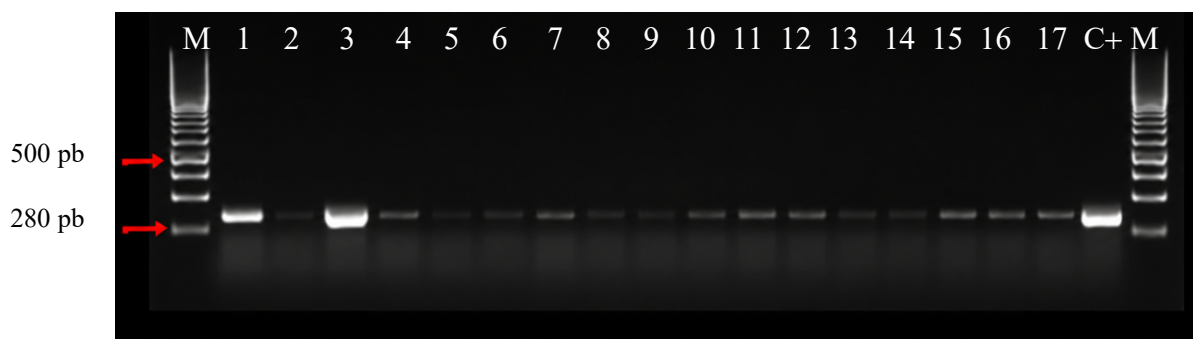


Figura 7. Verificación de *R. solanacearum* con el par de oligonucleótidos universal 759/760. Gel agarosa 1% teñido con gelred nucleic ácido 10000X; C+ control positivo; 1-17, Muestras a identificar, 280 pb, producto de PCR amplificado en el tamaño esperado para la identificación de la especie de *R. solanacearum*.

VI. CONCLUSIÓN

Mediante pruebas fenotípicas y técnica PCR convencional se identificó a biovar 1 y raza 3 y especies de *Ralstonia solanacearum*, para su posterior inoculación en conejos.

Se evidenció la producción de anticuerpos mediante aglutinación de células bacterianas y un título de anticuerpos policlonales de 1:256.

La prueba de aglutinación con anticuerpos policlonales mostro alta sensibilidad y especificidad al ser comparada con la técnica PCR

VII. RECOMENDACIÓN

Se recomienda continuar el desarrollo y validación de anticuerpos policlonales como herramienta de inmunodiagnosís para *Ralstonia solanacearum*.

Incorporar nuevos aislamientos bacterianos provenientes de distintos rubros y zonas de Nicaragua, con el fin de evaluar su reproducibilidad en diferentes condiciones epidemiológicas.

VIII. LITERATURA CONSULTADA

- Álvarez, E., Iglesia, A., García, A., & Blanco, E. (2008). Optimización de métodos serológicos para la detección de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi. *Revista de Protección Vegetal*, 23(1), 26–31. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v23n1/rpv05108.pdf>
- Andrade, D. M. (2012). Detección serológica del virus Mop-Top de la papa (PMTV) con anticuerpos policlonales obtenidos a partir de péptidos sintéticos del gen CP-RT [Tesis de pregrado]. Universidad de Nariño. <https://sired.udenar.edu.co/3108/>
- Arboleda, J. W., Delgado, F., & Valencia, A. (2004). Detección de beavericina en el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* mediante anticuerpos policlonales. *Revista Colombiana de Entomología*, 30(2), 125–130.
- Asamblea Nacional de Nicaragua. (2011). Ley 747. Ley para la protección y el bienestar de animales domésticos y silvestres domesticados. *La Gaceta*. <http://legislacion.asamblea.gob.ni/Normaweb.nsf/xpNorma.xsp?documentId=CF820E2A63B1B690062578B00074EC1B&action=openDocumenthttp://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v30n2/v30n2a01.pdf>
- Ascoli, C. A. (2018). Overlooked benefits of using polyclonal antibodies es [Beneficios pasados por alto del uso de anticuerpos policlonales]. *BioTechniques*, 65(3), 127–136. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0065>
- Bachmann, M. F., & Zinkernagel, R. M. (1997). Neutralizing antiviral B cell responses. es [Neutralización de las respuestas de las células β Antivirales] *Annual Review of Immunology*, 15, 235–270. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.235>
- Banco Central de Nicaragua. (2024, mayo 7). Informes, divulgación y prensa. <https://www.bcn.gob.ni/divulgacion-prensa/entrevista-al-compa%C3%B1ero-ovidio-reyes-presidente-del-banco-central-de-nicaragua-y>
- Barrios, M., Rodríguez, P y Salazar, M. (2011). Supervivencia de *Ralstonia solanacearum* en suelo y tejido de plantas de banano en Urabá, Colombia. *Fitosanidad*. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209122297004.pdf>
- Buddenhagen, I., & Kelman, A. (1964). Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. [Aspectos biológicos y fisiológicos de la marchitez bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum*] *Phytopathology*, 2, 203–230. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.02.090164.001223>
- Calvo, E. G. (2005). Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de *Ralstonia solanacearum* [Informe técnico]. Centro Internacional de Agricultura Tropical. http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_CIAT/ipm/pdfs/tesis_eduardo_gomez.pdf

- Cambra, M. (2010). Enfermedades virales y vectores emergentes: Avances en la detección fiable de virus, viroides y fitoplasmas en especies leñosas. *Phytoma*, 222, 71–74. <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/222-octubre-2010/enfermedades-virales-y-vectores-emergentes-avances-en-la-deteccion-fiable-de-virus-viroides-y-fitoplasmas-de-especies-lenosas>
- Canadian Council on Animal Care. (2022). *Identification of scientific endpoints, humane intervention points and monitoring regime for animals used in science (Guidelines)*. [Identificación de objetivos científicos, puntos de intervención humanitarios y régimen de monitorización para animales utilizados en la ciencia] https://ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/CCAC_guidelines_scientific_endpoints.pdf
- Center Potato International. (2018). How Potato Grows. [Cómo crece la patata] <https://cipotato.org/potato/how-potato-grows/>
- Centro Nacional para la Información Biotecnológica. (2020). *Taxonomy Browser*. [Navegador de taxonomías] National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Ralstonia+solanacearum>
- Chavarro, E., y Ángel, J. E. (2006). Establecimiento de un sistema diagnóstico para la detección de *Ralstonia solanacearum* y diferenciación genética mediante marcadores moleculares RAPD. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 3(1), 14–31. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/503/908>
- Coll-Morales, J. (1993). *Técnicas de diagnóstico de virología*. Díaz de Santos. <https://doi.org/9788479780913>
- Del Giudice, G., Rappuoli, R., & Didierlaurent, A. M. (2018). Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. [Correlatos de la actividad adyuvante: Una revisión sobre los adyuvantes en las vacunas autorizadas] *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 1–16. 10.1016/j.smim.2018.05.001
- Díaz, U. (2005). Caracterización preliminar de razas y biovares de *Rolstonia solanacearum* (E.F. Smith) Yabuuchi et-al, en Nicaragua. *La Calera*, 5(5), 24–31. <https://lacalera.una.edu.ni/index.php/CALERA/article/view/67>
- Dirección General de Sanidad Vegetal – Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. (2013). *Protocolo de diagnóstico de Ralstonia solanacearum (Smith, 1896) Yabuuchi et al. 1995: Marchitez bacteriana de la papa*. SENASICA–SAGARPA. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/746658/FICHA_T_CNICA_MOKO.pdf

- Dunbar, B., & Schwoebel, D. (1990). Preparation of polyclonal antibodies. [Preparación de anticuerpos policlonales] *Methods in Enzymology* (Vol. 182, pp. 663–670). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82051-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82051-3)
- Elphinstone, J. G. (2005). The current bacterial wilt situation: A global overview. [La situación actual de la marchitez bacteriana: Una vision general a nivel mundial] C. Allen, P. Prior, & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 9–28). APS Press. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20053172657>
- Fegan, M., Prior, P. & Hayward, C (2005). How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 449–461). APS Press. <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:71427>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024, mayo 30). El periplo de la papa a través de épocas y continentes. <https://www.fao.org/newsroom/story/the-potatos-travel-through-ages-and-continents/es>
- Fornos, A., Rivera, J., Sánchez, I., Monzón, A., y Ramírez, D. (2021). Razas, biovares y mecanismos de resistencia de aislados de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Nicaragua. *La Calera*, 21(37), 100–105. <https://doi.org/10.5377/calera.v21i37.12821>
- Gallo García, Y., Marín Montoya, M., & Gutiérrez Sánchez, P. (2002). Generación de anticuerpos policlonales para la detección de la variante genotípica GIII de PVY, en cultivos de tomate de árbol y papa de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 245–255. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752012000100023&script=sci_arttext
- González, A., Batista, N., Ortiz, M., Torres, V., Infante, J. F., & González, M. (2002). Evaluación de dos esquemas de inmunización para la producción de sueros hiperinmunes contra *Leptospira interrogans*. *Vaccinmonitor*, 11(3), 6–10. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203414592002>
- Hayward, A. C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. [Biología y epidemiología de marchitez bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum* *Phytopathology*, 26, 65–87. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., y Baptista, M. d. (2014). *Metodología de la investigación* (V. S. Méndez y C. Mendoza, Eds.). McGraw-Hill. https://apiperiodico.jalisco.gob.mx/api/sites/periodicooficial.jalisco.gob.mx/files/metodologia_de_la_investigacion_-_roberto_hernandez_sampieri.pdf
- Huamán, Z. (1986). *Botánica sistemática y morfología de la papa*. Centro Internacional de la Papa.

https://www.google.com.ni/books/edition/Systematic_Botany_and_Morphology_of_the/-7-hmoky01UC?hl=es&gbpv=1&dq=inauthor:%22Z%C3%B3simo+Huam%C3%A1n%22&printsec=frontcover

Huarte, M. A., y Capezio, S. (2013). *Cultivo de papa*. ResearchGate, 1–25. https://www.researchgate.net/publication/256195293_Cultivo_de_papa

Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria. (2024). *Lista de plagas no cuarentenarias de Nicaragua*. IPSA. https://assets.ippc.int/static/media/files/eventreporting/2024/06/07/LISTA_DE_PLAGAS_NO_CUARENTENARIAS_EN_NICARAGUA_VERSI%C3%93N_VII-JUNIO_2024.pdf

Klement, Z., Rudolph, K., & Sands, D. C. (Eds.). (1990). *Methods in phyto bacteriology* [Métodos en fitobacteriología]. Akadémiai Kiadó. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19912310531>

Kudlacek, S. T., Ching, K. H., Velappan, N., & Stevens, R. C. (2020). *Importance of antigen structure in the development of immunoassays* [Importancia de la estructura del antígeno en el desarrollo de inmunoensayos]. *Journal of Immunological Methods*, 483, 112811. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112811>

Leenaars, M., & Hendriksen, C. F. M. (2005). *Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: Evaluation and recommendations* [Pasos críticos en la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales: Evaluación y recomendaciones]. *ILAR Journal*, 46(3), 269–279. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.269>

Linnaeus, C. (1753). *Species plantarum: Exhibentes plantas rite cognitae ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas* (Vol. 1). Laurentii Salvii. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/84235>

Lomonte, B. (2007). *Manual de métodos inmunológicos*. Universidad de Costa Rica. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/server/api/core/bitstreams/84327c68-f3a0-4835-9d57-29f0b5a54228/content>

López, L. J. (1982). *Morfología y taxonomía de la papa*. Instituto Colombiano Agropecuario, División de Agronomía. <https://repository.agrosavia.co/items/cc76dcbd-dd79-4dca-89e1-6d4bda7b7c7c>

Machado, N. P., Téllez, G. A., y Castaño, J. C. (2006). Anticuerpos monoclonales: Desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Asociación Colombiana de Infectología*, 10(3), 186–197. <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v10n3/v10n3a06.pdf>

- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). *Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology* [Las 10 principales bacterias fitopatógenas en fitopatología molecular]. **Molecular Plant Pathology**, 13(6), 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Medina Gómez, L. M. (2020). *Evaluación de la tolerancia de portainjertos de tomate y berenjena para el manejo de Ralstonia solanacearum [Smith (1896) Yabuuchi et al., 1996], León Nicaragua, 2019*. Tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria. <https://repositorio.una.edu.ni/4074/1/tnf02m491.pdf>
- Microsoft Corporation. (2021). *Microsoft Excel*. Microsoft 365. <https://www.microsoft.com/en-us/microsoft-365/excel>
- Ministerio de Economía Familiar Comunitaria, Cooperativa y Asociativa. (2022). *Economía familiar: Documentos/Cartillas*. <https://www.economiafamiliar.gob.ni/webitemefcca-mvc/>
- Mishra, A. K., & Mariuzza, R. A. (2018). Insights into the structural basis of antibody affinity maturation from next-generation sequencing [Perspectivas sobre la base estructural de la maduración de afinidad de anticuerpos mediante secuenciación de nueva generación]. *Frontiers in Immunology*, (9) 117, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00117>
- Nakazamawa, M., Mukumoto, M., & Miyatake, K. (2016). *Production and purification of polyclonal antibodies* [Producción y purificación de anticuerpos policlonales]. *Methods in Molecular Biology*, 1474, 49–59. [10.1007/978-1-4939-6352-2_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6352-2_3)
- Corea Narváez, H. G., González Moya, R. O., & Reyes Castro, G. del C. (2024). *Aislamiento y patogenicidad de agentes asociados al mal seco en quequisque (Xanthosoma violaceum L. Schott), en Nicaragua*. **Siembra**, 11(2), e6796. <https://doi.org/10.29166/siembra.v11i2.6796>
- National Human Genome Research Institute. (2024, julio 10). *Glosario parlante de términos genómicos y genéticos*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary>
- National Institutes of Health. (2024). *Biblioteca Nacional de Medicina. Medline Plus*. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000821.htm#:~:text=La%20inmunidad%20innata%2C%20o%20inespec%C3%ADfica,defensa%20en%20la%20respuesta%20inmunitaria>
- National Research Council. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed.). The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12910>
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica: Fundamentos y guías* (M. T., Ed.). Editorial Médica Panamericana. <https://www.medicapanamericana.com/es-NI/libros/microbiologia-estomatologica-fundamentos-y-guia-practica-3a-edicion->

[duo?srsltid=AfmBOoqw-mP6yHEyURCymfqFnLmX0fU7IHRGcjQJR_tOaW4pNhoaLufm](https://doi.org/10.1007/s12248-017-0000-0)

- Noroña Castellano, J. P., & Tipanquiza Ibáñez, J. J. (2010). *Evaluación del comportamiento del cultivo de papa (Solanum tuberosum): Variedades INIAP-Natividad, INIAP Estela, versus testigo la variedad tradicional “Bolona” en el cantón Paute, provincia del Azuay* [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio Institucional UPS. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/4744>
- Opina, N., Tavner, F., Hollway, G., Wang, J., Li, T., Maghirang, R., Fegan, M., Hayward, A. C., Krishnapillai, V., & Holloway, B. (1997). A novel method for the identification of strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, 87(12), 1232–1238. <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:57627>
- Patiño, B., Castruita, J. P., Gutiérrez, J. P., Orozco, L. M., Virgen, G., Sanjuana, S. R., Villagómez, J. C., y Flores, L. L. (2017). Anticuerpos policlonales de *Fusarium* sp. como herramienta para el desarrollo de métodos de diagnóstico. *Jóvenes en la Ciencia*, 3(2), 42–45. <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/2257/1755>
- Peng, H. P., Lee, K. H., Jian, J. W., & Yang, A. S. (2014). *Origins of specificity and affinity in antibody-protein interactions* [Orígenes de la especificidad y afinidad en las interacciones anticuerpo-proteína]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(23), 8156–8161. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401131111>
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Ahluwalia, A. (2020). *The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research* [Las directrices ARRIVE 2.0: directrices actualizadas para el reporte de investigación en animales]. *British Journal of Pharmacology*, 177(16), 3617–3624. <https://doi.org/10.1111/bph.15193>
- Prior, P., & Fegan, M. (2005). *Avances recientes en la filogenia y clasificación de Ralstonia solanacearum* [Recent advances in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*]. *Acta Horticulturae*, 695, 149–156. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.14>
- Ralston, E., Palleroni, N. J., & Doudoroff, M. (1973). *Pseudomonas pickettii*, a new species of clinical origin related to *Pseudomonas solanacearum* [*Pseudomonas pickettii*, una nueva especie de origen clínico relacionada con *Pseudomonas solanacearum*]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23(1), 15–19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=329>

- Ren, X., Yu, D., Han, S., & Feng, Y. (2007). Thermolysis of recombinant *Escherichia coli* for recovering a thermostable enzyme [Termólisis de *Escherichia coli* recombinante para la recuperación de una enzima termoestable]. *Biochemical Engineering Journal*, 33(1), 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.09.017>
- Ríos Morales, G. (2007). Distribución y variabilidad de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de papa en Nicaragua [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Agraria. <https://repositorio.una.edu.ni/1366/1/tnh20r586.pdf>
- Rivas, T. N. (2022). Cuáles son las principales plagas y enfermedades de la papa (*Solanum tuberosum*) y sus medidas de control. UNM, Universidad Técnica de Machala. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/19806>
- Rodríguez, A., y Milenka, V (2005). Aislamiento y secuenciación de un aislado chileno de Grapevine Fanleaf Virus: Expresión del gen de la cápside y producción de anticuerpos policlonales con fines de inmunodiagnóstico [Tesis de maestría]. Universidad de Chile. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/186380>
- Rodríguez, L. E. (2010). Origen y evolución de la papa cultivada: Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 28(1), 9–17. <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v28n1/v28n1a02.pdf>
- Ruiz-Mesa, J. D., Sánchez-González, J., Reguera, J. M., Martín, L., López-Palmero, S., & Colmenero, J. D. (2005). Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas [Prueba de Rosa de Bengala: rendimiento diagnóstico y uso para el diagnóstico rápido de la brucelosis humana en servicios de urgencias en áreas endémicas]. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(3), 221–225. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01063.x.
- Saquicela, P. S., Romanova, E. V., Guamán, R. N., Ulloa, S. M., y Villavicencio, Á. F. (2023). Caracterización morfológica y bioquímica de *Ralstonia solanacearum* raza 2, bacteria patógena en cultivos de banano y plátano en El Carmen, Manabí, Ecuador. *Siembra*, 10(1), 1–17. <https://www.redalyc.org/journal/6538/653873378010/html/>
- Islam, M. S., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. R. (2017). A review on macroscale and microscale cell lysis methods [Revisión de los métodos de lisis celular a macro y microescala]. *Micromachines*, 8(3), 83. <https://doi.org/10.3390/mi8030083>
- Smith, E. F. (1896). A bacterial disease of the tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.). U.S. Department of Agriculture, División de Fisiología y Patología Vegetal. <https://biotanz.landcareresearch.co.nz/references/f0adc057-ef3c-41ca-8bab-7557ebf551df>
- Smith, R., Brown, A., & Lee, H. (2019). Polyclonal antibody production in several rabbit models: Inter-individual variability and considerations. *Frontiers in Immunology*, 10, 1234. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01234>

- Spinreact. (2023). Rosa de Bengala: Inserto técnico para prueba de aglutinación en porta [Manual]. Spinreact.
https://www.spinreact.com/files/Inserts/Serologia/SGIS07_Rosa_Bengala_2020.pdf
- Stokes, W. S. (2002). Humane endpoints for infectious disease animal models. *ILAR Journal*, 43(S1), S31–S40. https://doi.org/10.1093/ilar.43.Supplement_1.S31
- Student (1908). The probable error of a mean. *Biometrika*, 6(1), 1–25.
<https://doi.org/10.1093/biomet/6.1.1>
- Suarez, P. (2020). Aplicaciones clínicas de los anticuerpos recombinantes. Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia. <https://idus.us.es/server/api/core/bitstreams/6d68e3d1-7398-4148-ae9f-4ef98ffafe81/content>
- Talib, N. A. A., Salam, F., & Sulaiman, Y. (2018). Electrochemical biosensors for detection of foodborne pathogens: A review [Biosensores electroquímicos para la detección de patógenos transmitidos por alimentos: una revisión]. *Molecules*, 23(4), 789.
<https://doi.org/10.3390/molecules23040789>
- Tian, W., Wang, L., Lei, H., Sun, Y., & Xiao, Z. (2018). Antibody production and application for immunoassay development of environmental hormones: A review [Producción de anticuerpos y aplicación en el desarrollo de inmunoensayos para hormonas ambientales: una revisión]. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 5(1), 5.
<https://doi.org/10.1186/s40538-018-0117-0>
- Van Regenmortel, M. H. V. (1996). Mapping epitope structure and activity: From one-dimensional prediction to four-dimensional description of antigenic specificity. *Methods*, 9(3), 465–472. <https://doi.org/10.1006/meth.1996.0054>
- Vargas-Hernández, C., & Vidal Salgado, L. E. (2014). Medición de la absorbancia óptica de soluciones acuosas mediante la instrumentación virtual y el control [Optical absorbance measurement of aqueous solutions using virtual instrumentation and control]. *Scientia et Technica*, 19(1), 49–53.
<https://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/8897>
- Vega-Robledo, G. B. (2009). Anticuerpos. *Inmunología para el médico general*, 52(5), 136–138.
https://revistafacmed.com/index.php?option=com_phocadownload&view=file&id=1984:inmunologia-para-el-mdico-general-anticuerpos&Itemid=79
- Wang, Y., Zhang, X., & Zhao, L. (2019). Evaluation of immune protection induced by DNA vaccines from *Haemaphysalis longicornis* paramyosin in rabbits. *Parasites & Vectors*, 12, 226. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3475-1>
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., & Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species

of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. [Propuesta del género *Burkholderia* gen. nov. y transferencia de siete especies del género *Pseudomonas* grupo de homología II al nuevo género, con la especie tipo *Burkholderia cepacia*]. *Microbiology and Immunology*, 36(12), 1251–1275. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1992.tb02129.x>

Zhao, L., Chen, H., & Li, Q. (2017). The rabbit antibody repertoire: Diversity, applications, and implications for polyclonal antibody production. *Frontiers in Immunology*, 8, 494. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00494>

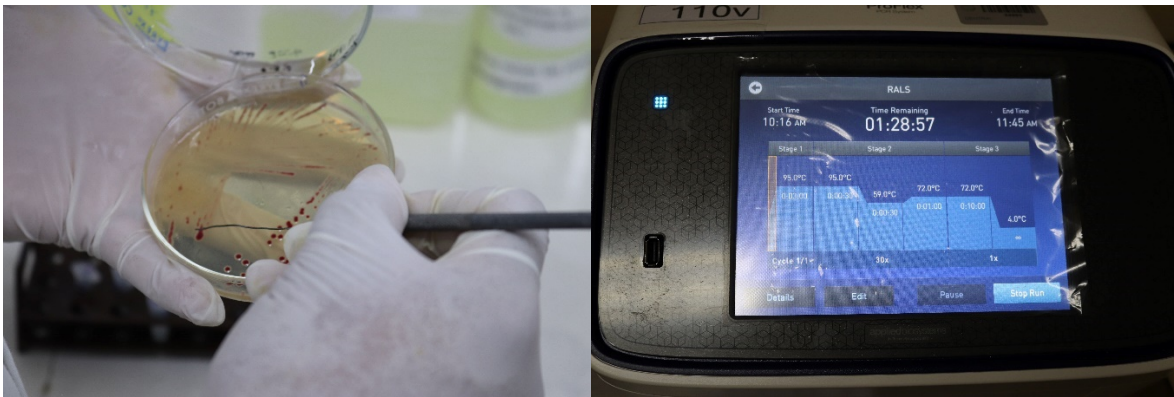
IX. ANEXOS

Anexo 1. Prueba T-Student, salida de InfoStat

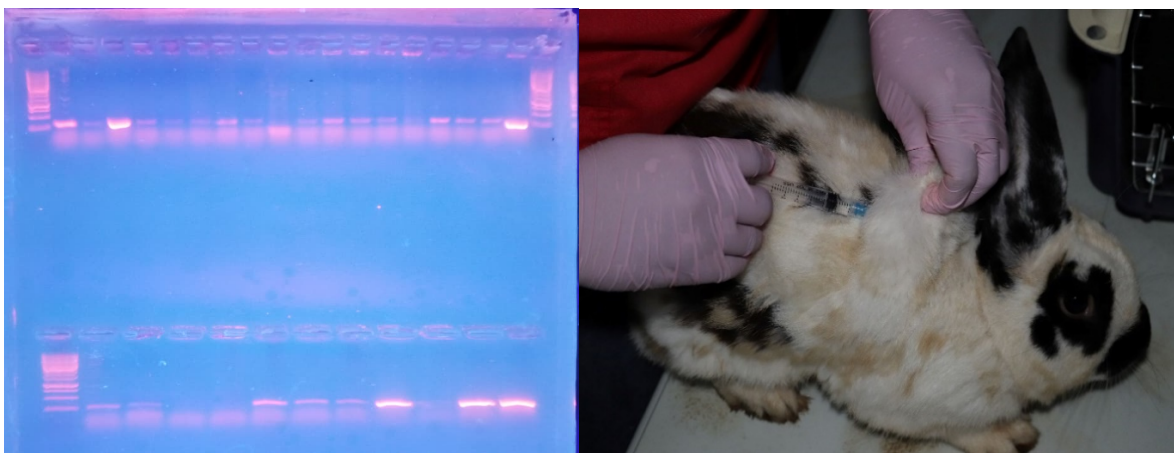
Prueba T (muestras apareadas)

<u>Obs (1)</u>	<u>Obs (2)</u>	<u>N</u>	<u>media(dif)</u>	<u>DE(dif)</u>	<u>T</u>	<u>Bilateral</u>
<u>antiRS PCR</u>		<u>30</u>	<u>0.07</u>	<u>0.25</u>	<u>1.44</u>	<u>0.1608</u>

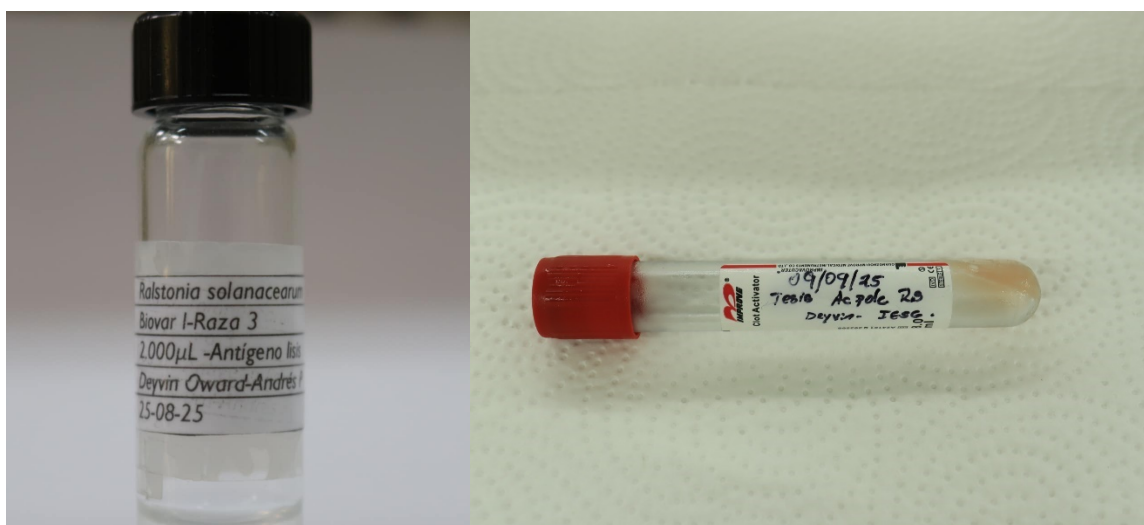
Anexo 2. Colonia de *R. solanacearum* y programa de amplificación PCR



Anexo 3. Electroforesis de *R. solanacearum* e inoculación del antígeno



Anexo 4. Solución antígeno y almacenamiento del antisuero



Anexo 5. Prueba de aglutinacion con anticuerpos en campo



Anexo 6. Modelo de predicción

Predicción de sensibilidad y especificidad	
Sensibilidad	100%
Especificidad	100%
VPP	100%
VPN	100%

